

Veränderung der globalen Genexpressionsmuster bei *Vibrio parahaemolyticus* unter Hitze- und Kältestress

Sara Urmersbach¹, Thomas Alter¹, Greta Gözl¹, Stephan Huehn¹ und Tommi Aho²

¹ Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Deutschland

² Institut für Chemie und Bioengineering, Abteilung für Signal Processing, Tampere University of Technology, Finnland

Hintergrund

Vibrio (V.) parahaemolyticus ist ein potentiell pathogenes Bakterium mit ubiquitärem marinen Ursprung. Die Spezies wird regelmäßig aus Meerwasser, Sediment und rohen oder unzureichend gegartem Meerestieren (z.B. Krustentiere, Muscheln) isoliert. Dabei zeigt sich in Muscheln eine bis zu 1000-fache Anreicherung der Bakterien verglichen mit dem umgebenden Meerwasser. Der Verzehr von kontaminierten rohen bzw. unzureichend erhitzten Muscheln und Fischprodukten kann zu *Vibrio*-Infektionen führen. Durch Umweltbedingungen, die zum Beispiel bei der Lagerung von Fisch vorherrschen, wird die Genexpression von *V. parahaemolyticus* beeinflusst. Nicht letaler Hitze- und Kältestress induzieren zelluläre Schutzmechanismen, zum Beispiel eine vermehrte Produktion von Chaperonen, als Antwort auf Hitzestress. Diese erhöhte Genexpression kann das Überleben der Bakterien gegenüber den entsprechenden Bedingungen erhöhen. Hitze und Kälte werden auch zur Verringerung der Keimzahl in Lebensmitteln verwendet. Die Genexpression in dem Grenzbereich zwischen subletaler Schädigung und Abtötung wurde für *V. parahaemolyticus* bisher nicht umfassend untersucht.

Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss von Temperaturveränderungen auf die globale Genexpression von *V. parahaemolyticus* zu untersuchen. Hierbei wurde das Hauptaugenmerk auf die verschiedenen Temperaturen gelegt, um die Änderung der Genexpression in möglichst kleinen Ausschnitten zu untersuchen.

Ergebnisse & Diskussion

Zur Qualitätssicherung wurde die Expression ausgewählter Gene (z.B. *groES*, *groEL*, *cspA*) mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) bestimmt. Die Microarray-Ergebnisse wiesen im Vergleich zur qPCR einen R² Wert von 0,653 auf (Daten nicht gezeigt). Dieser zeigt an, wie gut die Korrelation der Daten ist, und stellt sicher, dass aussagekräftige Daten vorliegen. Die Vergleiche der Hybridisierungen einer Temperatur wurden mittels Heatmaps auf Reproduzierbarkeit geprüft (Abb. 1). Alle Temperaturen wurden auf 37 °C normalisiert. Herunterregulation wird hierbei in grün angezeigt, Heraufregulation hingegen in rot.

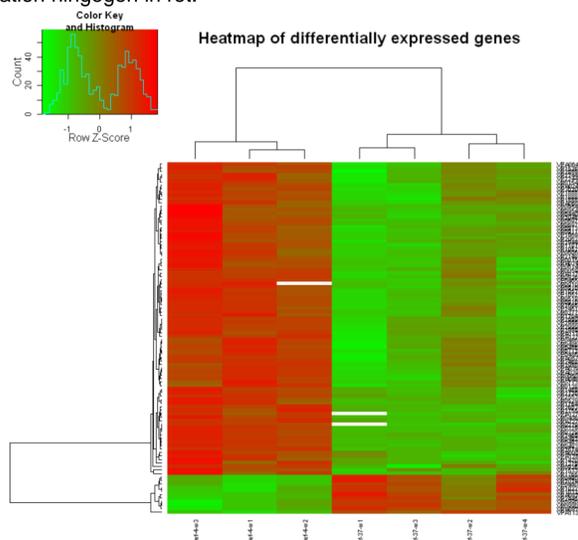


Abb.1 Heatmap der Genexpressionen 4 °C vs 37 °C
Heatmap-Vergleich der Inkubationen bei 4 und 37 °C. Die 100 höchst signifikant, differentiell exprimierten Gene sind dargestellt.

Die Volcano plot Analyse veranschaulicht die Verteilung der 4820 Datenpunkte (Abb. 2). Dabei werden Gene mit mindestens zweifacher Änderung der Genexpression im Vergleich zur Expression bei 37 °C sowie einem p -value $\leq 0,05$ in rot dargestellt. Nicht exprimierte Gene sind in blau dargestellt und wurden in den Analysen nicht näher betrachtet. Insgesamt waren 3% (144) der Gene bei 20 °C, 7,4% (358) bei 4 °C, 10,8% (522) bei 15 °C und 13,3% (639) bei 42 °C signifikant reguliert.

Die Genexpression bei 15 und 42 °C zeigten ein ähnliches Muster. Jedoch wird hier eine antagonistische Expression ersichtlich (Abb. 3). Insgesamt wurden 83 Gene antagonistisch exprimiert, lediglich 26 homolog. Beide Temperaturen weichen 5 °C vom nativen Temperatursegment ab, was auf die ähnliche Ausprägung der Genregulation hinweisen könnte. Bei 20 °C waren mehr Gene herunter reguliert als herauf, wohingegen bei 4 °C mehr herauf reguliert waren.

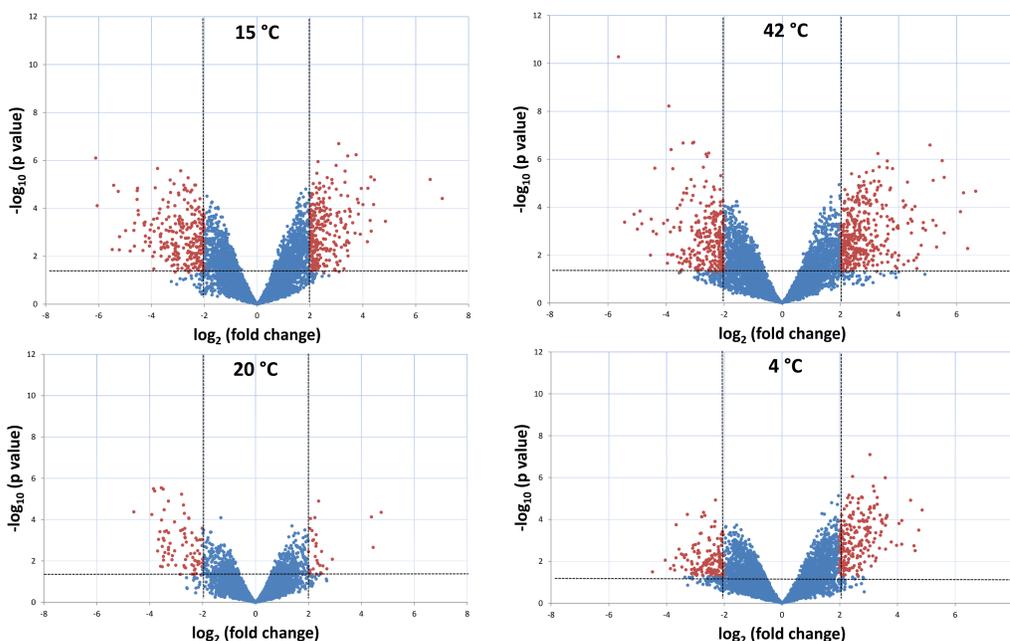


Abb.2 Volcano plots der Genexpression

Institut für Lebensmittelhygiene • FU Berlin • Königsplatz 69 • 14163 Berlin • Tel. 030 - 838 - 62538 • Fax 0 30 - 838 - 62552 • lebensmittelhygiene@fu-berlin.de • www.vetmed.fu-berlin.de

Material und Methoden

Inkubation und RNA-Extraktion

Kulturen mit 10⁸ bis 10⁹ CFU des vollständig sequenzierten *V. parahaemolyticus* Stammes RIMD 2210633 wurden unter aeroben Bedingungen bei 4 °C, 15 °C, 20 °C, 37 °C und 42 °C für 30 min inkubiert und anschließend die gesamt-RNA isoliert (peqGold Bacterial RNA Kit; Peqlab, Erlangen, Deutschland). Es wurden mindestens 3 biologische Replikate je Bedingung analysiert.

Qualitätskontrolle

Die RNA-Proben wurden mittels Agilent RNA 6000 Nano Kit im 2100 Bioanalyzer überprüft (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und nur weiterverwendet, wenn der RNA Integritätswert >9 betrug.

Labeling, Hybridisierung und Generierung der Signale

Die RNA-Proben wurden mit Cy3 gelabelt und auf 8x15k *Vibrio* Pangenom-Arrays (Agilent) hybridisiert.

RT-qPCR

Aliquots der RNA-Proben wurden in cDNA umgeschrieben (RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit mit random hexamer Primern; Fermentas) und für RT-qPCR Sybr-Green Assays (SsoFast Eva Green Supermix; BioRad, Hercules, USA) verwendet. Die resultierenden log₂ FC dienten zur Qualitätskontrolle mittels Korrelation mit den Microarray-Ergebnissen

Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurden R und Bioconductor [1] genutzt. Die Bibliotheken wurden mit Limma [4] und Amap [5] erstellt. Die Genset Anreicherungsanalysen wurden mittels der Internet basierten Datenbank für Annotierung, Visualisierung und integrierter Genermittlung (DAVID) [2,3] erstellt.

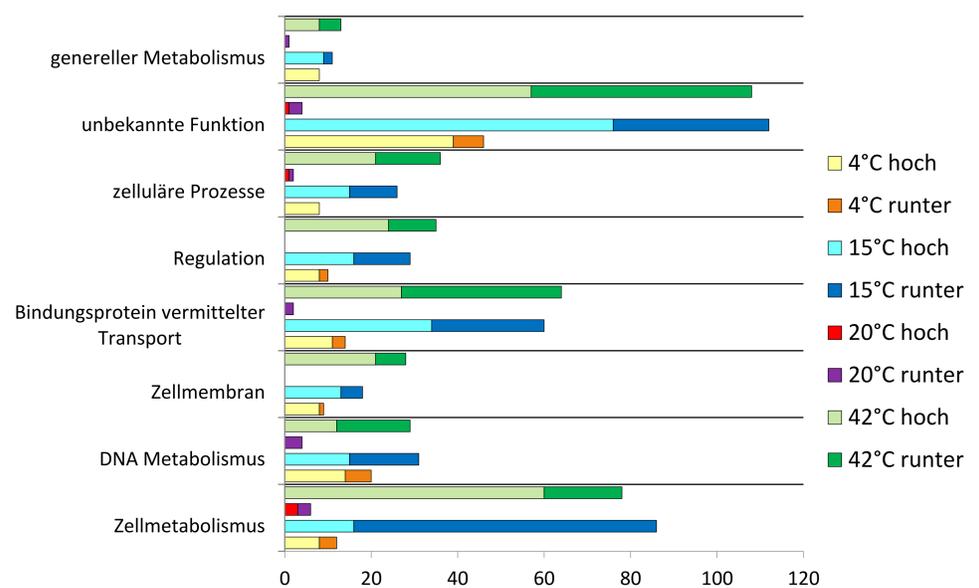


Abb.3 Funktionale, differentielle Genexpression (p -value <0,05)

Die Analyse der differentiellen Genexpression (Abb. 3) zeigte, dass vor allem bei 15 und 42 °C viele Gene reguliert wurden. Hierbei wurden viele als unbekannt klassifizierte Gene herauf- bzw. herunterreguliert. Weiterhin wurden Gene, die an zellulären Prozessen, Bindungsprotein vermitteltem Transport sowie dem Zellmetabolismus beteiligt sind, deutlich reguliert. Die 83 antagonistisch regulierten Gene wurden ca. zur Hälfte bei 15 °C herauf- (41) bzw. herunterreguliert (42). Die 26 homolog exprimierten Gene waren zu 69% (18) bei beiden Temperaturen heraufreguliert.

In dem Temperatursegment von 20 bis 37 °C scheint der native Bereich zu liegen, da hier nur 3% der Gene signifikante Expressionsunterschiede zeigten.

Bei 4 °C waren deutlich weniger Gene signifikant exprimiert als bei 15 und 42 °C. Jedoch ist bei einer so niedrigen Umgebungstemperatur der Stoffwechsel verlangsamt, was einen dämpfenden Effekt auf die Expression bewirken könnte. Es hätte evtl. einer längeren Inkubationszeit bedurft, um Effekte zu sehen. Insgesamt lassen sich hier aber auch Trends ablesen, da bekannte Kälteschockgene wie z.B. *cspA* entsprechend reguliert sind.

Conclusio

Die Untersuchung der Genexpression von *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 ergab deutliche Unterschiede der temperaturabhängigen Regulation. Viele der Gene, die Expression zeigten, sind bis dato in Ihrer Funktion noch unbekannt.

Bei 20 °C zeigten lediglich 3% der Gene signifikante Expressionsunterschiede, wobei mehr Gene herunterreguliert waren. Im Gegensatz dazu waren bei 4 °C viele Gene heraufreguliert.

Bei den Inkubationstemperaturen 15 und 42 °C waren insgesamt 10,8% bzw. 13,3% der Gene signifikant reguliert. Hierbei wurden Gene, die an zellulären Prozessen, Bindungsprotein vermitteltem Transport sowie dem Zellmetabolismus beteiligt sind, deutlich reguliert. Bei 83 Genen lag eine antagonistische Regulation vor. Wohingegen lediglich 26 Gene homolog exprimiert und hiervon 69% heraufreguliert waren.

Da Gengruppen häufig komplexer reguliert sind als lediglich herauf oder herunter, sind anspruchsvolle statistische Methoden zur Analyse notwendig. Hierbei wird nicht nur das Ausmaß der Regulation bewertet, sondern ob eine Gruppe in derselben Richtung reguliert wird. Hierbei werden Web basierte Datenbanken wie zum Beispiel die Datenbank für Annotierung, Visualisierung und integrierter Ermittlung (DAVID) genutzt. Die via DAVID detektierten Regulationscluster werden noch im Detail analysiert.

Das Projekt wurde im Rahmen des VibrioNet durchgeführt, welches mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01KI015A gefördert wird.

